

응집성 *Sacchromyces cerevisiae*를 이용한 반복 유가식 ethanol 생산에서의 최적 운전전략

이상은 · 연지현 · 서용창¹ · 강도형² · 이현용¹ · 정경환*

충주대학교 바이오산업학과, ¹강원대학교 생물소재공학전공, ²한국해양연구원

Optimal Strategy for Ethanol Production in Repeated Fed-batch Operation Using Flocculent *Sacchromyces cerevisiae*

Sang-Eun Lee, Ji-Hyeon Yeon, Yong Chang Seo¹, Do Hyung Kang², Hyeon-Yong Lee¹, and Kyung-Hwan Jung*

Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea

¹Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan, Gyeonggi-do 426-744, Korea

Abstract We investigated the optimal strategy for ethanol production using flocculent *Sacchromyces cerevisiae* ATCC 96581. Considering the characteristic of flocculent yeast, a repeated fed-batch ethanol fermentation was designed, in which non-sterile glucose powder was fed every 12 hours and, after cell flocculation, new feeding medium was exchanged every 24 or 36 hours. We particularly compared this fermentation process with those when cell flocculation was not carried out. Finally, the maximal total ethanol production was 825 g-ethanol during 120 hours, in which the time interval of withdrawal-fill of feeding medium was 24 hours and cell flocculation was carried out.

Keywords: flocculent yeast, *Sacchromyces cerevisiae* ATCC 96581, repeated fed-batch culture, ethanol production

서 론

그동안 다양한 바이오매스로 부터의 바이오에탄올 생산 연구가 시도 되어왔고, 바이오에탄올 생산을 위한 다양한 운전방법도 효율성과 경제성 측면에서 연구되어왔다 [1,2]. 다양한 운전방법에는 세포의 특성을 고려한 유가식 운전 [3,4], 반복 유가식 운전 [5,6], 세포 재회수 방법 [7,8], 세포 고정화법 [9,10] 등이 그 대표적인 예이다. 그 중에서 응집성 효모를 이용한 운전방법은 효모 균체 손실 없이 다양한 연속식 운전법이 가능하기 때문에 생산성 향상 측면에

서 연구의 대상이 되어왔다 [11-14]. 한편 바이오에탄올 생산에서 고농도의 에탄올을 빠른 시간 내에 생산하는 것이 증류 비용을 낮추며, 공정의 운전비용을 낮추는 방법임이 보고되었고 [15], 그러한 이유로 본 연구팀을 포함한 몇몇 보고에서 에탄올 농도를 고농도로 높이기 위한 연구가 시도 되어왔다 [16-21].

본 연구에서는 응집성 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ATCC 96581를 이용하여 jar fermentor에서 반복 유가식 에탄올을 생산할 때 가장 효율적이고 경제성 있는 운전전략에 대하여 연구하였다. *S. crevisiea* ATCC 96581는 펄프산업의 폐기물인 spent sulfite liquor에서 발견한 효모로서 바이오매스 가수분해물에 존재하는 제해물질에 대하여 내성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [20-23]. 본 연구팀은 선행 연구에서 고농도의 에탄올을 생산할 때

*Corresponding author

Tel: +82-43-820-5246, Fax: +82-43-820-5272

e-mail: khjung@cjnu.ac.kr

미량의 공기 첨가효과에 대하여 조사하였고, 이를 이용한 반복 유가식 운전법에 대한 선행연구를 실시하였다 [19,23,24]. 그리고 또 다른 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 24858을 이용한 반복 유가식 운전전략에 대하여도 선행연구를 실시하였다 [25]. 본 연구에서는 이러한 선행연구 결과와 응집성 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 96581을 이용한 연구 결과에 대하여서도 비교분석 하려고 한다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서는 응집성 (flocculent) 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 96581 사용하여 연구를 수행하였다.

반복 유가식 에탄올 발효

종배양을 위해 300 mL 삼각플라스크에 YPD 배지 (yeast extract; 10 g/L, peptone; 20 g/L, glucose; 20 g/L) 100 mL을 만든 후 30°C, 150 rpm에서 배양하여 발효조에 접종하였다.

반복 유가식 에탄올 발효 시 5.0 L 발효조 (KoBiotech, Republic of Korea)를 사용하여 배양 부피 1.5 L로 실시하였으며, 초기 배지 조성은 포도당 100 g/L (경우에 따라서 60 혹은 200 g/L로도 배양), CSL (corn steep liquor) 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 12 g/L, KH₂PO₄ 24 g/L, MgSO₄·7H₂O 12 g/L 이었다. 배양온도는 27°C, pH는 4.0, 교반속도는 200 rpm, 공기주입속도는 0.33 vvm으로 조절하였으며, pH 보정 시 산으로는 인산 (10%, v/v), 염기로는 암모니아수를 사용하였다.

배양 시 12시간 마다 포도당 소비를 측정된 후 비멸균 포도당 분말을 넣는 방법을 택하였다. 또한 24시간 또는 36시간 마다 전체 배양액을 수확하여 0.5 L가 되게 한 후, 포도당을 제외한 1.5 L의 미리 멸균 시켜 놓은 새로운 배지를 feeding하여 2.0 L까지 채운 뒤 비멸균 포도당 분말을 넣었다. Feeding medium의 조성은 CSL 20 g/L, yeast extract 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.2 g/L, KH₂PO₄ 2.4 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.2 g/L이었다.

배양에 사용한 포도당 (Daesang Corp., Republic of Korea), CSL (Corn Product Korea, Republic of Korea), 그리고 yeast extract (Choheung Chemical Co., Republic of Korea)는 모두 값이 저렴한 산업용 성분을 사용하였다.

Flocculation을 이용한 반복 유가식 에탄올 발효

운전방법은 반복 유가식 에탄올 발효와 같은 방법으로 12시간마다 포도당 소비를 측정하곤 후 비멸균 포도당 분말을 넣는 방법을 택하였고, 24시간 또는 36시간 간격으로 배양액을 수확하여 새로운 배지는 넣는 방법을 사용하였다. 배양액을 수확하기 위하여 배양액의 교반을 멈추고, 공기

공급을 중단시킨 뒤 일정시간 균주를 가라앉혀 응집 시키고 상층의 배양액을 수확 하였다. 그리고 미리 멸균 시켜 놓은 1.5 L의 feeding medium과 비멸균 포도당 분말을 채워주어 배양을 계속 진행하였다.

반복 유가식 발효 중 ethanol inhibition

Run # 8에서 72시간 까지 배양을 진행한 후, 배양액을 5 mL를 취하여 4°C, 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 멸균 증류수를 5 mL 넣어 cell을 풀어준 뒤, OD₆₀₀ (Optical Density at 600 nm)을 약 4.5로 맞추었다. 그리고 이 세포용액 5.0 mL를 YPD 배지 50 mL가 포함된 250 mL flask에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 배양하였다. 이때 control로서 YPD에서 배양된 세포를 같은 방법으로 준비하여, YPD 배지 50 mL가 포함된 250 mL 삼각플라스크에 접종하여 배양하였다.

분석방법

Dry cell weight (DCW)는 spectrophotometer (Spectronic, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 600 nm (OD₆₀₀)에서 측정한 흡광도와 DCW의 표준곡선으로부터 구하였다. 배지내의 잔여 포도당의 측정은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하였으며 [26], 배양액의 에탄올 함량은 FID (flame ionization detector)가 장착된 gas chromatography (8610C, SRI, USA)를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼은 Chromosomb 101 [L=6 ft, ID=1/8 inch, 80/100 mesh, stainless steel tubing (Alltech, USA)]을 사용하였고, 기타 조건은 선행연구에 기술하였다 [25].

Kinetic parameter 계산

일정시간 간격의 구간별 에탄올 생산성 (instantaneous ethanol productivity)은 $P(i)$ 로, 에탄올 수율 (instantaneous ethanol yield)는 $Y_{E/S}(i)$ 로, 비 포도당 소비속도 (instantaneous specific ethanol production rate)는 $Q_S(i)$ 로, 비 에탄올 생산속도 (instantaneous specific ethanol production rate)는 $Q_P(i)$ 로 각각 표시하였으며, 아래와 같이 계산하였다.

$$Y_{E/S}(i) = \frac{E_2 - E_1}{S_2 - S_1} \quad (\text{g-ethanol/g-glucose})$$

$$P(i) = \frac{E_2 - E_1}{t_2 - t_1} \quad (\text{g-ethanol/L/h})$$

$$Q_S(i) = \frac{S_2 - S_1}{X_{avg}} \quad (\text{g-glucose/g-cell/h})$$

$$Q_P(i) = \frac{P(i)}{X_{avg}} \quad (\text{g-ethanol/g-cell/h})$$

여기서 E_2, E_1, S_2, S_1 는 time t_2, t_1 에서의 에탄올 농도와 포도

당 농도이며, X_{avg} 는 time t_2 과 t_1 사이의 평균세포 농도이다. 총 에탄올 생산의 % increase는 아래의 식에 의해서 계산하였다.

$$\frac{E_n - E_1}{E_1} \cdot 100$$

여기서 E_1 은 Run #1에서의 총 에탄올 생산이고, E_n 은 Run #n에서의 총 에탄올 생산이다.

결과 및 고찰

반복 유가식 ethanol 생산; Feeding medium 추가 시간이 36시간

Table 1에서와 같이 초기 포도당 농도는 60에서 200 (g/L) 이고 12시간마다 비멸균 포도당 분말을 첨가하고 36시간마다 feeding medium을 새로이 첨가하는 반복 유가식 에탄올 생산을 실시하였다 (Run # 1-5). 이 때 36시간마다 Run # 1에서는 feeding medium을 새롭게 첨가하기 전에 500 mL의 배양액을 제외한 나머지 배지를 세포와 함께 수확하였고, Run # 2-5에서는 새로운 feeding medium을 첨가하기 전에 세포를 응집시켜 가라앉힌 후 상층부를 수확하였다.

Table 1. Repeated fed-batch ethanol fermentations in this study

Run #	Initial glucose concentration (g/L)	Cell flocculation ¹	Time interval of NSGP ² addition (h)	Glucose concentration after NSGP addition (g/L)	Time interval of feeding medium addition (h)
1	60	-	12	150	36
2	60	+	12	150	36
3	60	+	12	200	36
4	200	+	12	200 (250 at 12 h) ³	36
5	100	+	12	200 (250 at 12 h) ³	36
6	100	-	12	200 (250 at 12 & 24 h) ³	24
7	100	+	12	200 (250 at 12 h) ³	24
8	100	+	12	200 (250 at 12 & 24 h) ³	24

- 1 : + and - represent whether cell flocculation was carried out (+) or not (-).
- 2 : Non-sterile glucose powder.
- 3 : Glucose concentration after NSGP addition was 250 (g/L), particularly at this time.

그 결과 Fig. 1에서와 같은 세포성장, 포도당 소모와 에탄올 생산 양상을 보였고, 배양액을 수확하기 전의 평균 에탄올

농도는 약 120 (g/L) 정도를 보였다. 이 때의 에탄올 생산은 초기 포도당 농도, 첨가한 포도당의 양, 세포를 응집시키는 여부에 관계없이 큰 차이를 보이지 않았다.

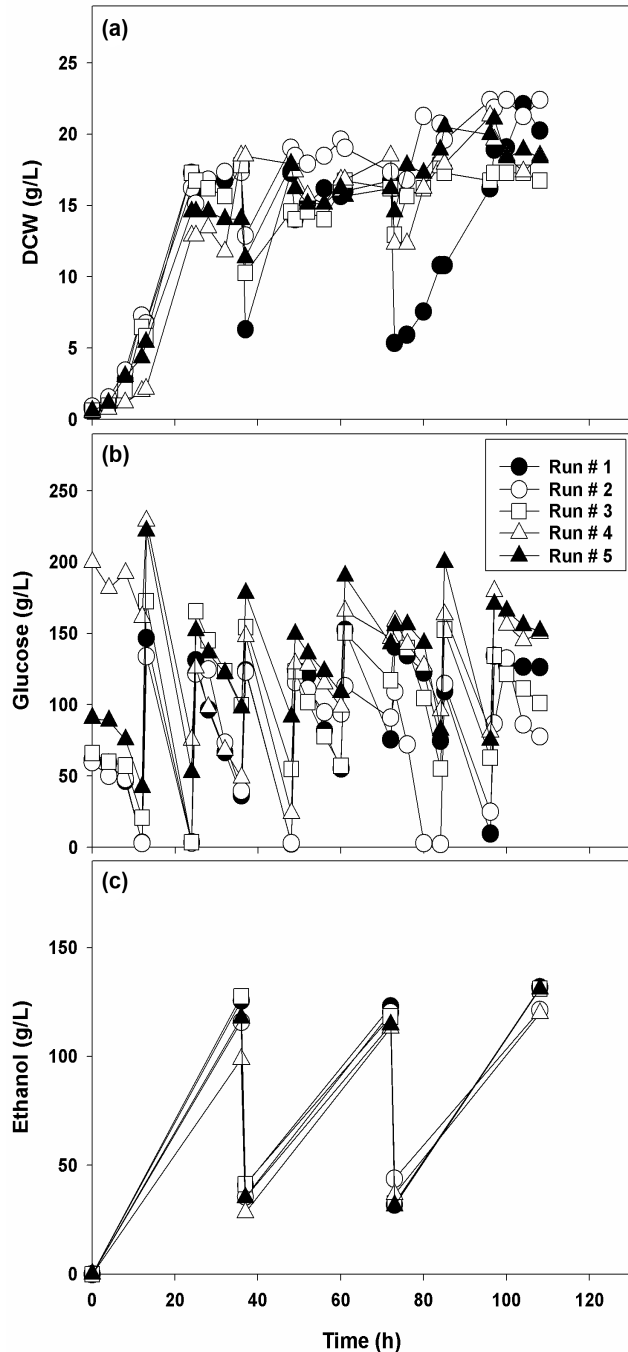


Fig. 1. Repeated fed-batch ethanol fermentations of *S. cerevisiae* ATCC 96581. (a) Dry cell weight, (b) residual glucose concentration, and (c) ethanol production. Time interval of withdrawal-fill of culture medium is 36 h. Table 1. describes the operational strategies of Run # 1-5. The symbols legend in figure panel B describes all the symbols in panel A and C.

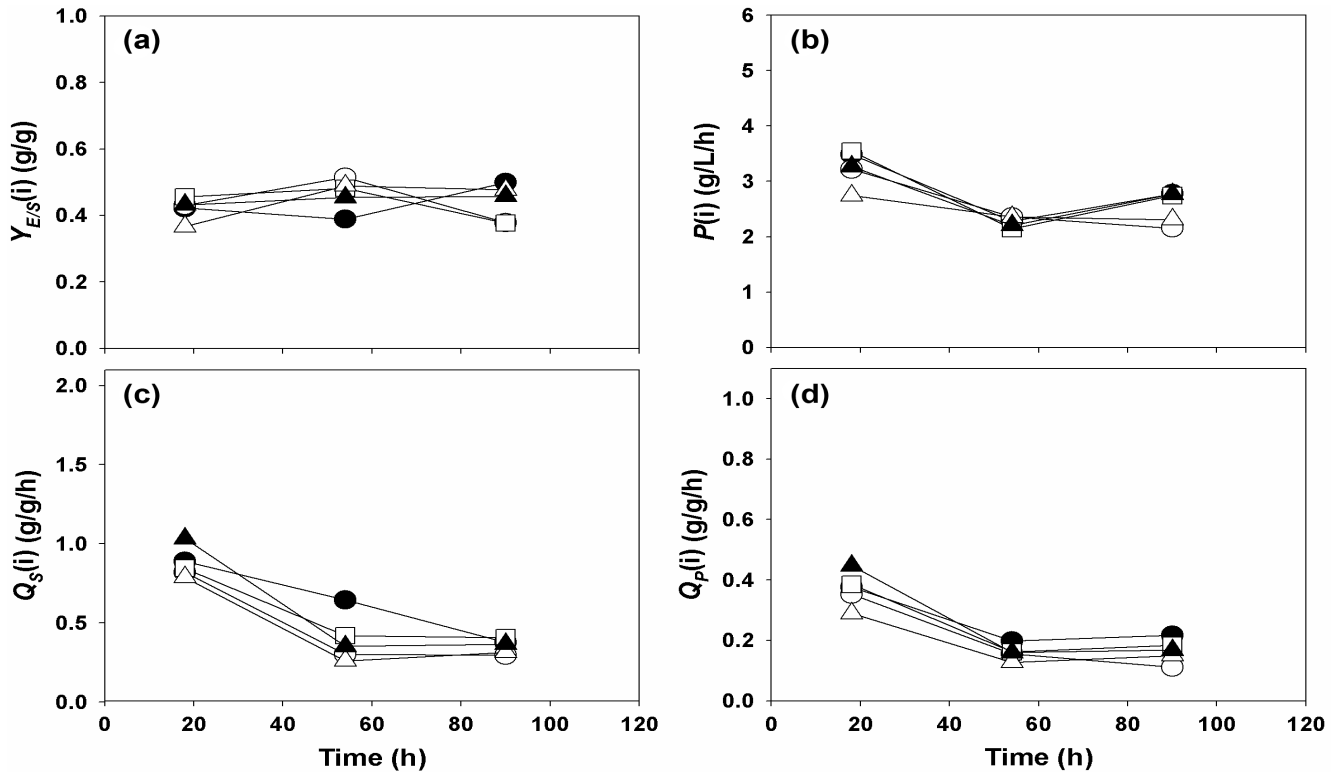


Fig. 2. (a) Instantaneous ethanol yield ($Y_{ES}(i)$), (b) instantaneous ethanol productivity ($P(i)$), (c) instantaneous specific glucose consumption rate ($Q_S(i)$), and (d) instantaneous specific ethanol production rate ($Q_P(i)$) of *S. cerevisiae* ATCC 96581 during repeated fed-batch ethanol fermentations. Table 1. describes the operational strategies of Run # 1-5. Symbols are the same as those used in Fig. 1.

한편, Fig. 1에서의 반복 유가식 에탄올 생산을 kinetic parameters ($Y_{ES}(i)$, $P(i)$, $Q_S(i)$, $Q_P(i)$) 측면에서 조사하였다 (Fig. 2). 배양조건과 관계없이 $Y_{ES}(i)$ 는 약 80% 정도의 에탄올 생산 이론 수율을 보였으며 (Fig. 2(a)), $P(i)$ 는 2.5-3.0 (g/L/h) 정도의 에탄올 생산성을 보였고 (Fig. 2(b)), $Q_S(i)$ 와 $Q_P(i)$ 는 초반부의 값이 배양이 진행되면서 점차 감소하는 현상을 보였다 (Fig. 2(c)와 2(d)). 또한 총 에탄올 생산을 비교해본 결과 Fig. 3과 같이 응집을 시키지 않은 경우에는 493 (g) (Run # 1)의 총 에탄올 생산을 보였고, 응집을 시킨 경우에는 최고 559 (g) (Run # 5), 최저 460 (g) (Run # 2)을 보였다. 즉 반드시 응집을 시킨 경우에서 총 에탄올 생산이 최고 값을 보이지는 않았다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 응집 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 96581 이용은 반복 유가식 에탄올 생산에서 세포를 응집시켜 상층 배양액만 제거하는 방식으로 배양하는 것이 에탄올 생산 및 생산성에 큰 장점이 되지 않음을 알 수 있었다. 또한 36시간 이후부터 에탄올 농도가 100 (g/L) 이상이 되면서 Fig. 2의 (c)와 (d)와 같이 포도당 소비속도와 에탄올 생산속도가 급격히 감소하였기 때문에 feeding medium을 되도록 빨리 교체해주고, 배양 초반부에 포도당 농도를 올려주는 방향으로 유가식 에탄올 생산 공정을 새롭게 고안하였다 (Run # 6-8) (Table 1).

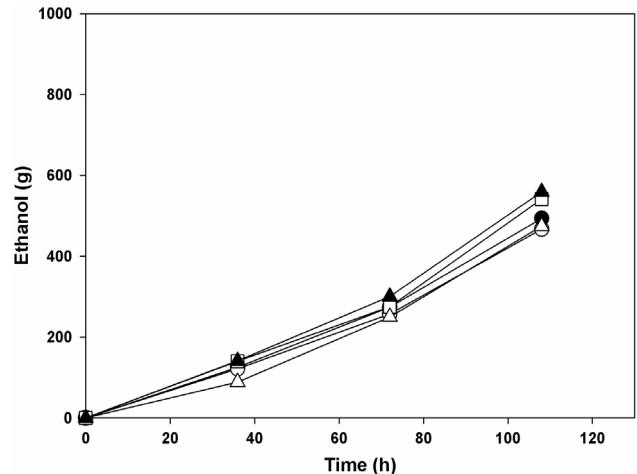


Fig. 3. Total cumulative ethanol production of *S. cerevisiae* ATCC 96581 during repeated fed-batch ethanol fermentations. Table 1. describes the operational strategies of Run # 1-5. Symbols are the same as those used in Fig. 1.

반복 유가식 ethanol 생산

위의 연구 결과를 개선하기 위하여 Table 1과 같이 초기 포도당 농도를 100 (g/L)로 하고, 12시간마다 비멸균 포도

당 분말을 첨가하고 24시간마다 feeding medium을 새로이 첨가하는 반복 유기식 에탄올 생산을 실시하였다 (Run # 6-8).

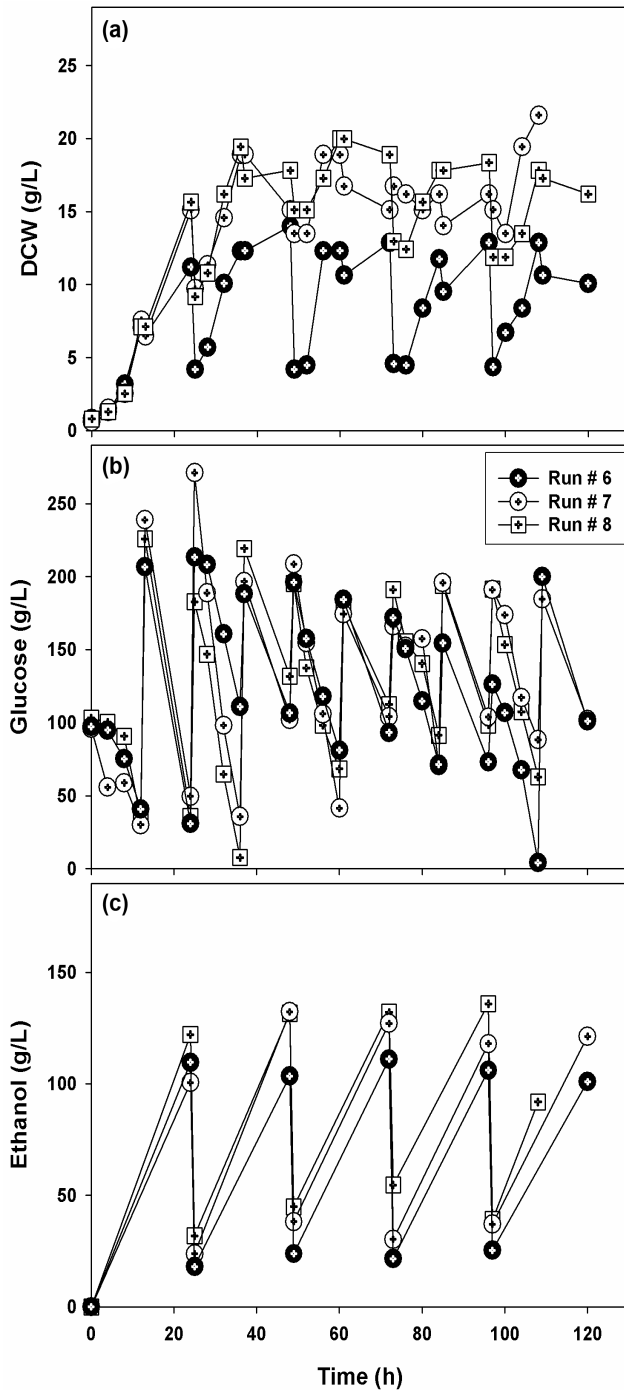


Fig. 4. Repeated fed-batch ethanol fermentations of *S. cerevisiae* ATCC 96581. (a) Dry cell weight, (b) residual glucose concentration, and (c) ethanol production. Time interval of withdrawal-fill of culture medium is 24 h. Table 1. describes the operational strategies of Run # 6-8. The symbols legend in figure panel B describe all the symbols in panel A and C.

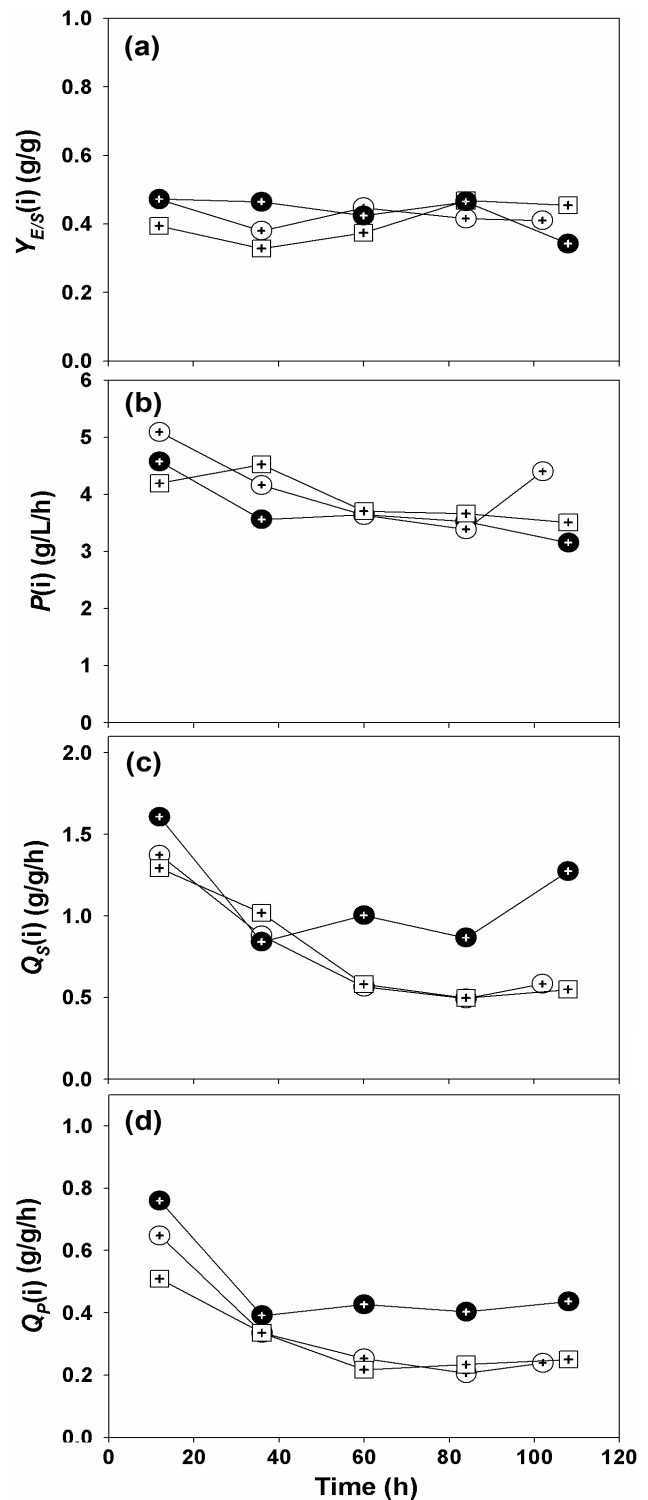


Fig. 5. (a) Instantaneous ethanol yield ($Y_{E/S}(i)$), (b) instantaneous ethanol productivity ($P(i)$), (c) instantaneous specific glucose consumption rate ($Q_S(i)$), and (d) instantaneous specific ethanol production rate ($Q_P(i)$) of *S. cerevisiae* ATCC 96581 during repeated fed-batch ethanol fermentations. Table 1. describes the operational strategies of Run # 6-8. Symbols are the same as those used in Fig. 4.

이 때 24시간마다 Run # 6에서는 feeding medium을 새롭게 첨가하기 전에 500 mL의 배양액을 제외한 나머지 배지를 세포와 함께 수확하였고, Run # 7과 8에서는 새로운 feeding medium을 첨가하기 전에 세포를 응집시켜 가라앉힌 후 상층부를 수확하였다.

그 결과 Fig. 4와 같이 세포성장, 포도당 소비 그리고 에탄올 생산을 관찰 할 수 있었다. 이 때 세포를 응집 시킨 것이 보다 더 높은 세포성장을 보였고, 에탄올 생산량에 있어서는 응집 시키지 않은 경우에 평균 약 105 (g/L)의 에탄올 생산량을 보였고, 응집 시킨 경우에는 평균 약 120 (g/L)의 에탄올 생산량을 보였다. 또한 kinetic parameters ($Y_{ES}(i)$, $P(i)$, $Q_S(i)$, $Q_P(i)$)를 분석한 결과 Fig. 5에서와 같이 평균 약 80%의 $Y_{ES}(i)$ 값을 보였고 (Fig. 5(a)), 약 3.5-5.0 (g/L/h)의 에탄올 생산성 ($P(i)$)을 보였다 (Fig. 5(b)). $Y_{ES}(i)$ 값은 Run # 1-5까지의 값과 유사하였으나 $P(i)$ 값은 Run # 1-5보다 약 50% 정도의 증가를 보였다. $Q_S(i)$ 와 $Q_P(i)$ 의 분석에서 보면 응집을 시킨 경우에는 (Run # 7과 8) 시간이 지나감에 따라서 그 값이 감소하나 그 최저값이 Run # 1-5 보다는 좀 더 높게 유지가 되었다. 이것은 Run # 1-5보다 더 자주 배지를 교체하였기 때문에 얻어진 결과라고 생각되어진다. 그러나 응집을 시키지 않은 경우에 (Run # 6) Fig. 5(c)와 Fig. 5(d)에서와 같이 배양 후반부의 급격한 값의 감소가 응집을 시킨 것에 비하여 적었다. 이는 구간별 평균 세포농도가 상대적으로 낮기 때문이고, 새로운 세포의 성장으로 인하여 보다 많은 포도당의 소비가 되었고, 그 새로운 세포가 상대적으로 아직까지는 에탄올에 대한 저해가 심하지 않았기 때문인 것으로 생각되어진다.

이를 확인하기 위하여 Run # 8의 72시간 배양액에서 채취한 세포를 seed로 사용하여 flask culture와, YPD medium에서 배양된 seed를 사용한 control 배양과 비교하였다 (Fig. 6). Fig. 6(a)에서와 같이 에탄올 저해가 심한 유가식 배양 공정에서 채취된 세포는 상대적으로 YPD medium에서 배양된 세포에 비하여 초기 성장이 매우 느렸고, Fig. 6(b)에서와 같이 포도당 소비도 초반부에 느렸으며, Fig. 6(c)와 같이 에탄올 생산도 늦게 시작되었다. 이 결과는 Run # 7과 8에서 에탄올의 저해현상 때문에 더 이상 포도당 첨가나 배지의 교체방법을 이용하여 배양액 중의 에탄올 농도를 올릴 수가 없다는 것을 보여주는 것이다. 또한 이렇게 에탄올에 의해서 저해를 받은 세포가 새로운 배지에서 지체시간을 경과한 후 정상적으로 세포의 성장과 포도당 소비, 에탄올 생산이 세포의 분열을 통하여 이루어질 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다. 이것은 Fig. 5의 (c)와 (d)에서 응집 시키지 않고 배양액을 수확한 Run # 6에서 보다 높은 $Q_S(i)$ 와 $Q_P(i)$ 값을 보이는 결과와도 일치한다고 하겠다. 즉 Run # 6에서도 새로운 세포성장이 계속해서 일어나기 때문에 새로운 세포가 어느 정도 에탄올 저해를 극복하여 구간별로 높은 $Q_S(i)$, $Q_P(i)$ 값을 보이는 것으로 생각되어진다. 종합적으로 Run # 6-8의 총 에탄올 생산을 계산하여 본 결과 Fig. 7에서와 같이 응집을 하지 않은 경우에는 689 (g) (Run

6), 응집을 실시한 경우 Run # 7에서는 724 (g), Run # 8에서는 825 (g)의 결과가 나왔다. 이것은 Run # 1-5의 평균 값에 비하면 약 67%정도 증가된 값이다. 이것은 Run # 1에 비하면 Run # 7의 경우에는 46.8%, Run # 8의 경우에는 50.5%의 생산량 증가를 의미하는 것이다 (Fig. 8).

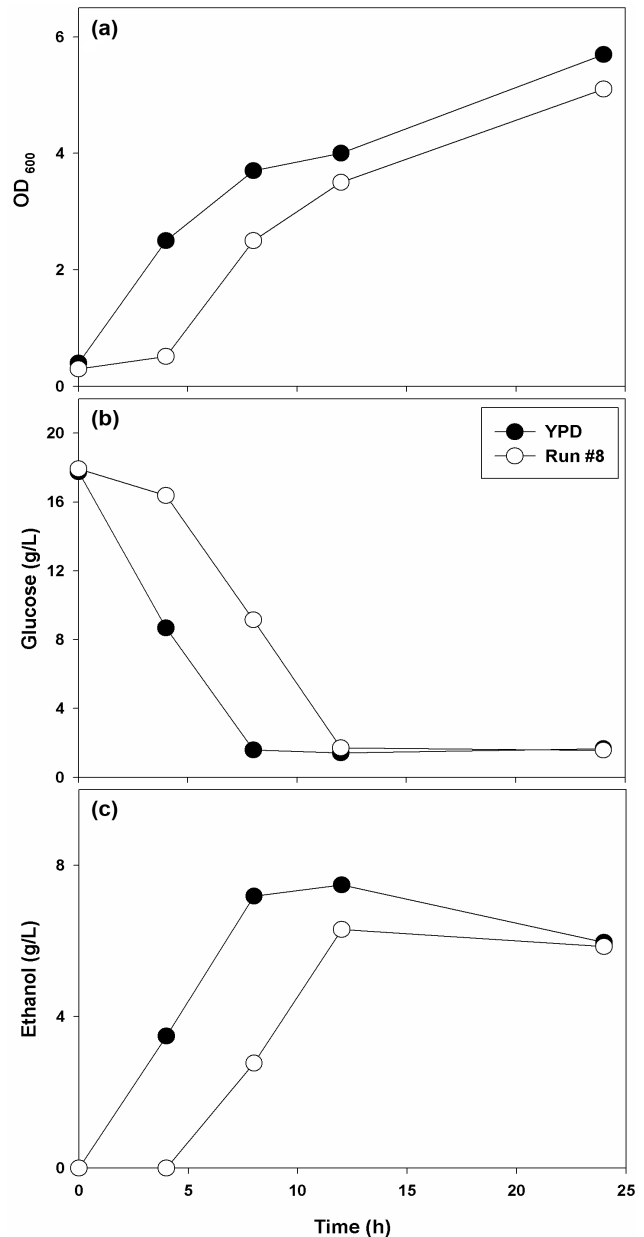


Fig. 6. Flask cultures using the cells harvested from repeated fed-batch culture. ○; Seed was prepared using the cell harvested from Run # 8 at 72 h, ●; Seed was prepared using the cell harvested from flask culture (YPD medium).

응집성 효모에 대한 에탄올 생산에 관한 연구결과를 조사해보면 Ma 등 [14]은 약 76-78 (g/L)의 에탄올을 repeated-batch 배양으로 만드는 공정을 발표하였고, Baptista 등 [13]

은 고정화 연속반응기에서 40 (g/L)의 에탄올을 만드는 방법을 소개하였다. 또한 Andrietta 등 [11]은 tower reactor에서 약 30-70 (g/L)의 에탄올을 만드는 공정을 연구하였다. 대부분의 응집성 효모를 이용한 에탄올 생산 공정은 최종 에탄올 농도 보다는 생산성 향상에 중점을 두어 연구되어 왔다 [11,13,14]. 본 연구에서는 생산성 보다는 증류 비용을 고려한 고농도의 에탄올이 함유된 배양액을 얻는 것이 목표였기 때문에 다른 응집성 효모를 이용한 연구에 비하여 상대적으로 생산성은 낮아도 최종 배양액의 에탄올 농도는 약 120 (g/L) 정도로 높았다. 본 연구팀의 선행 연구결과에서도 이와 같은 운전전략을 사용하여 repeated fed-batch culture에서 약 100 (g/L) 이상의 에탄올을 생산하는 공정을 완성하였다 [24,25].

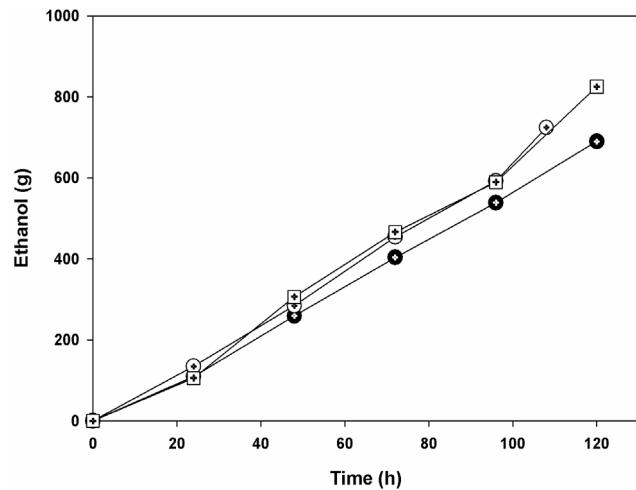


Fig. 7. Total cumulative ethanol production of *S. cerevisiae* ATCC 96581 during repeated fed-batch ethanol fermentations. Table 1. describes the operational strategies of Run # 6-8. Symbols are the same as those used in Fig. 4.

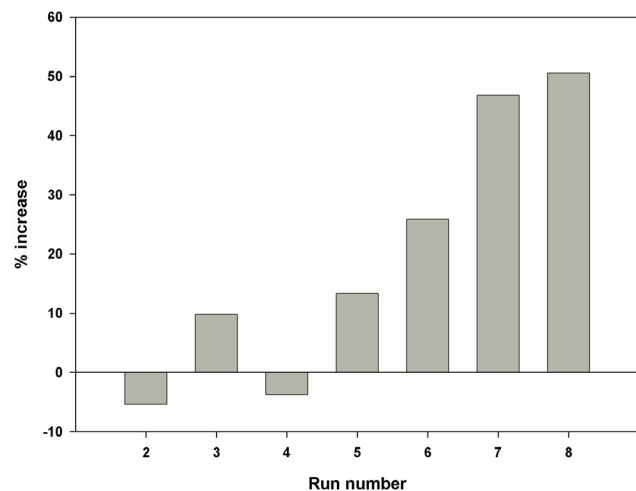


Fig. 8. Percent increases of total cumulative ethanol production of *S. cerevisiae* ATCC 96581 during repeated fed-batch ethanol fermentations.

결론

반복 유가식 방법을 이용하여 에탄올을 생산할 때 응집성 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 96581을 사용하였다. 이때 비멸균 포도당 분말을 12시간 마다 첨가하고, 배지를 24시간 마다 교체하였고, 배지 교체 시에는 세포를 응집 시켜서 그 상층액만을 수확하였다. 그 결과 120시간 만에 총 825 (g)의 에탄올을 생산할 수 있었다.

요약

응집성 효모인 *S. cerevisiae* ATCC 96581를 이용한 최적의 에탄올 생산 공정 전략에 대하여 연구하였다. 효모의 특성을 고려하여, 효모 응집공정이 있는 반복 유가식 공정을 설계하였고, 이때 비멸균 포도당 분말을 매 12시간 마다 첨가하였고, 새로운 feeding medium을 24시간 혹은 36시간 마다 세포 응집 후 교체 하였다. 이때 효모 응집이 없는 반복 유가식 공정과 비교 검토하였다. 최종적으로 24시간마다 세포를 응집시키고 상층배지를 제거하고 새로운 배지를 넣으면서 반복 유가식 에탄올 생산을 하는 것이 최적의 조건임을 알 수 있었고, 이때 120시간 동안 825 g의 에탄올을 생산 할 수 있었다.

감사

This work was supported by Korea Ocean Research & Development Institute (Project No. PP00740), Republic of Korea. The author thanks Ms. Hye-Ji Kim, Ms. Ga-Young Shin, Ms. Ji-Eun Lee for their technical assistance.

접수 : 2010년 3월 21일, 게재승인 : 2010년 4월 23일

REFERENCES

1. Sánchez, Ó. J. and C. A. Cardona (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270-5295.
2. Sassner, P., M. Galbe, and G. Zacchi (2008) Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 32: 422-430.
3. Taherzadeh, M. J., C. Niklasson, and G. Lidén (1999) Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. *Bioresour. Technol.* 69: 59-66.
4. Alfenore, S, X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux,

- J. L. Uribelarrea, G. Goma, C. Molina-Jouve, and S. E. Guillouet (2004) Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 537-542.
5. Ozmihci, S. and F. Kargi (2007) Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 169-174.
 6. Morimura, S., Z. Y. Ling, and K. Kida (1997) Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 271-274.
 7. Warren, R. K., D. G. Macdonald, and G. A. Hill (1994) The design and costing of a continuous ethanol process using wheat and cell recycle fermentation. *Bioresour. Technol.* 47: 121-129.
 8. Nishiwaki, A. and I. J. Dunn (1999) Analysis of the performance of a two-stage fermentor with cell recycle for continuous ethanol production using different kinetic models. *Biochem. Eng. J.* 4: 37-44.
 9. Najafpour, G., H. Younesi, and K. S. K. Ismail (2004) Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 92: 251-260.
 10. Swain, M. R., S. Kar, A. K. Sahoo, and R. C. Ray (2007), Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Res.* 162: 93-98.
 11. Andrietta, S. R., C. Steckelberg, and M. da G. S. Andrietta (2008) Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. *Bioresour. Technol.* 99: 3002-3008.
 12. Zhao, X. Q. and F. W. Bai (2009) Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production. *Biotechnol. Adv.* 27: 849-856.
 13. Baptista, C. M. S. G., J. M. A. C6ias, A. C. M. Oliveira, N. M. C. Oliveira, J. M. S. Rocha, M. J. Dempsey, K. C. Lannigan, and P. S. Benson (2006) Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 127-131.
 14. Ma, K., M. Wakisaka, K. Sakai, and Y. Shirai (2009) Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. *Bioresour. Technol.* 100: 2289-2292.
 15. Huang, H. -J., S. Ramaswamy, U. W. Tschirner, and B. V. Ramaraob (2008) A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Sep. Purif. Technol.* 62: 1-21.
 16. Bai, F. W., L. J. Chen, W. A. Anderson, and M. Moo-Young (2004) Parameter oscillations in very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 558-566.
 17. Bai, F. W., L. J. Chen, Z. Zhang, W. A. Anderson, and M. Moo-Young (2004) Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.* 110: 287-293.
 18. Thomas, K. C., S. H. Hynes, A. M. Jones, and W. M. Ingledew (1993) Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 43: 211-226.
 19. Seo, H. -B., S. S. Kim, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2009) High-level production of ethanol during fed-batch ethanol fermentation with a controlled aeration rate and non-sterile glucose powder feeding of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 591-598.
 20. Lind6n, T., J. Peetre, and B. Hahn-H6gerdal (1992) Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1661-1669.
 21. Martin, C. and L. J. J6nsson (2003) Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 386-395.
 22. Brandberg, T., C. J. Franz6n, and L. Gustafsson (2004) The fermentation performance of nine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures in dilute-acid wood hydrolysate. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 122-125.
 23. Seo, H. -B., J. -H. Yeon, M. H. Jeong, D. H. Kang, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2009) Aeration alleviates ethanol inhibition and glycerol production during fed-batch ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 599-605.
 24. Seo, H. -B., J. -H. Yeon, M. H. Jeong, D. H. Kang, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2010) Long-term repeated fed-batch ethanol production in aerated condition. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15: 324-328.
 25. Lee, S. -E., H. -B. Seo, M. C. Kwon, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2010) Operational strategy for increasing ethanol production in repeated fed-batch ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. *KSBB J.* 25: 187-192.
 26. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy (1986) *Carbohydrate analysis; A Practical Approach*. p. 3. IRL press, Oxford, UK.